

氏 名	和田 崇之
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	第4940号
学位授与年月日	平成18年12月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文名	Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by Real-Time PCR (リアルタイムPCRを用いた薬剤耐性結核迅速判定のための2プローブ系検出法)
論文審査委員	主査教授 小倉 壽 副査教授 葭山 稔 副査教授 日野 雅之

### 論文内容の要旨

【目的】一塩基多型を分析する方法として使用されているリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で、結核菌の薬剤感受性関連遺伝子の突然変異、すなわち、薬剤耐性を簡便に、かつ短時間で検出する手法の確立を目的とした。

【方法】抗結核薬(リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール)に対する薬剤耐性は各薬剤関連標的遺伝子、リファンピシン: *rpoB* (507-533番目のアミノ酸を規定する81 bp)、イソニアジド: *katG* (315番目のSerを規定する部位)、エタンブトール: *embB* (306番目のMetを規定する部位)などの突然変異で生じていることが報告されている。そこで、これらの領域に特異的に結合するTaqMan MGBプローブ(7種類)および非変異領域に結合する対照MGBプローブを構築した。薬剤耐性結核菌45株からゲノムDNAを抽出し、リアルタイムPCRで8種のプローブによる蛍光強度の差を解析した。また、結核患者喀痰から抽出したDNA(27検体)についても同様の解析を行い、本検出系の臨床応用への有用性を評価した。また、臨床研究の実施に際し、患者からインフォームドコンセントを得た。

【結果】本検出系で解析したところ、供試菌が点突然変異の存在しない野生型の塩基配列をもつ場合及び対照プローブでは、増幅回数に比例して蛍光強度の上昇が観察された。しかし、塩基配列に変異が存在すると、その部位に対応するプローブのみ蛍光強度は上昇しなかった。蛍光強度の減衰は、一定強度の蛍光を発現するために必要なPCR増幅回数(Ct)の比較によって定量化される。従って、対照プローブと標的部位に対応する各プローブとの差分( $\Delta Ct$ )を解析することで突然変異の有無が容易に検出可能となった。喀痰検体から抽出したDNAについても、解析領域をPCRによりあらかじめ増幅しておくことで同様の結果が得られた。

【結論】本研究により構築されたリアルタイムPCRによる結核菌遺伝子の突然変異検出法は高感度、かつ判定も容易であるため、多検体処理や迅速診断において極めて有用であり、結核医療への応用が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

薬剤耐性結核の判定は治療法の確定という点において重要であるが、結核菌は増殖速度が非常に遅く、現行の培養判定法では数ヶ月以上もの時間を要する。近年において、薬剤耐性は特定の遺伝子に生じた突然変異に起因することが報告されており、これを同定することが迅速な薬剤耐性の判定法として注目され、種々の迅速判定法が開発されている。本研究は、一塩基多型を分析する方法として使用されているリアルタイムPCRシステムを用いて、薬剤感受性関連遺伝子の突然変異を簡便に、かつ短時間で検出する手法の開発を目的としたもの

である。

リファンピシン、イソニアジド、エタンブトールに対する薬剤感受性に関連する遺伝子領域と相補的に結合するTaqMan MGBプローブ（7種類）及び非変異領域に結合する対照プローブを構築し、薬剤耐性結核菌45株由来のゲノムDNA及び結核患者喀痰27検体由来の抽出DNAに対してリアルタイムPCRを施行して8種のプローブによる蛍光強度の差を解析した。その結果、薬剤耐性結核の起因たる変異部位と相補的結合するプローブのみ蛍光強度が上昇せず、対照プローブとの蛍光強度比較によって変異の有無が容易に判定できることが確認された。喀痰検体由来のDNAについて蛍光強度が充分でない場合、解析領域を前増幅（nested PCR）することによって同様の結果が得られた。本システムでは蛍光色素を2種類使用することで反応チューブの本数を抑え、より簡便に操作を行なうことを可能にしている（2プローブ系）。

以上、本研究により構築された薬剤耐性結核菌の突然変異検出システムは高感度かつ迅速に標的遺伝子の変異を検出することが可能となった。本論文はリアルタイムPCRを応用した薬剤耐性結核の迅速判定法を確立したものであり、この研究成果は薬剤耐性結核の早期診断及び蔓延阻止に直接的に寄与するものとして、博士（医学）の学位を授与されるに値すると判定した。